

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

010477①
SAH
#2
7-13-01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2000年 3月22日

出願番号
Application Number: 特願2000-080270

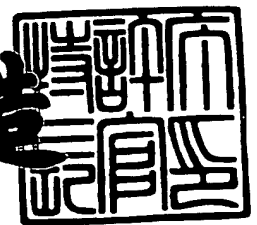
出願人
Applicant(s): 富士写真フイルム株式会社



2001年 2月 2日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3001100

【書類名】 特許願
【整理番号】 6023
【提出日】 平成12年 3月22日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/50
【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号
富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 川崎 和也

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号
富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 中村 健太郎

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水三丁目11番46号
富士写真フイルム株式会社内

【氏名】 天野 芳和

【特許出願人】

【識別番号】 000005201

【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代表者】 宗雪 雅幸

【代理人】

【識別番号】 100085109

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 政浩

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000402

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9801175

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 乾式分析素子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 水不透過性支持体の上が水不透過性枠体で仕切られ、その枠内に分析に必要な試薬を有している、展開層を有しない乾式分析素子

【請求項 2】 水不透過性支持体の上に親水性ポリマー層が設けられている請求項 1 記載の乾式分析素子

【請求項 3】 親水性ポリマー層が分析に必要な試薬を含む試薬層である請求項 2 記載の乾式分析素子

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は臨床分析分野等において少量の試料で迅速かつ簡便に分析できる分析具に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

血液、尿等を検体として分析し、人の病気を診断する方法は古くから行なわれている。

【0003】

この分析方法は湿式法と乾式法に大別されるが、従来の乾式分析素子などを用いた乾式法では比色分析における光学濃度の低下を示す場合や凝集反応、凝固反応などを利用した分析を行なうことができない場合がある。

【0004】

湿式法は、容器に検体と必要な試薬溶液を入れて溶液中で検出反応させ、測定を行なうものである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

湿式法の問題点は、大量の検体を要しかつ簡便性と迅速性に欠ける点にある。すなわち、1 分析項目毎に 0.1 ～ 0.5 ml 程度を要するもので、複数分析項

目を分析する場合には相当量の検体を必要とし、特に血液分析などの場合には被検者に大きな負担をかけることになる。また、試薬の添加についても各試薬を各容器毎に添加しているので手間と時間がかかり、分析機器全体も大型になる。

【0006】

一方、乾式法では比色分析において光学濃度の低下を示す場合や、凝集反応、凝固反応などの測定を行なうことができない場合がある。

【0007】

本発明の目的は、少量の検体で簡便かつ迅速に測定でき、しかも比色分析において光学濃度が低下する場合や凝集反応、凝固反応なども測定できる分析具を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

従来の乾式分析素子の大きな特徴は展開層にある。すなわち、乾式分析素子に供給された検体を展開層で、検体に含有されている成分を実質的に偏在させることなく平面的に拡げて単位面積当りほぼ一定量の割合でその下の層に供給することによって安定性を確保しており、この展開層の開発によってはじめて乾式分析素子を完成することができたのである。

【0009】

ところが、本発明者が、光学濃度が低い比色分析や凝集反応、凝固反応を用いた分析を乾式分析素子を用いて行なうことを検討した結果、展開層が存在すると、光透過性支持体側から反射測光する際にこの展開層が反射板として機能して光を乱反射させてしまうため、比色分析の場合は展開層中で生成した色素の一部が比色測定できなくなること、また濁度測定のような光散乱の程度を求める測定はできないことを見出した。

【0010】

そこで、展開層によらないで定量性を確保できる手段を幅広く検討した結果、水不透過性シートを水不透過性枠体で仕切ることによって定量性を確保でき、この枠体で仕切られた枠内に試薬を存在させ、あるいは枠体と水不透過性シートの間に乾式分析素子の試薬層を介在させることによって、検体を十分な精度で分析

でき、しかも分析反応が比色分析のほか凝集反応、凝固反応を含むものであっても測定できることを見出して本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、水不透過性支持体の上が水不透過性枠体で仕切られ、その仕切られた枠内に分析に必要な試薬を有している、展開層を有しない乾式分析素子と、水不透過性支持体の上に親水性ポリマー層が設けられている上記記載の乾式分析素子に関するものである。

【0012】

本発明の乾式分析素子では供給された検体を仕切られた枠内に一定量ずつ保持して微小液柱が形成され、これに試薬と任意に存在する親水性ポリマー層が溶け出し、あるいはこの微小液柱が親水性ポリマー層に吸収されて検出反応が起こる。

【0013】

【発明の実施の形態】

水不透過性支持体としては、これまで乾式分析素子に使われている公知の水不透過性の透明支持体を用いることができる。具体的には、ポリエチレンテレフタレート、ビスフェノールAのポリカーボネート、ポリスチレン、セルロースエステル（例えば、セルロースジアセテート、セルローストリアセテート、セルロースアセテートプロピオネート等）等から成る厚さ約 $50\mu\text{m}$ ～ 1mm 、好ましくは約 $80\mu\text{m}$ ～約 $300\mu\text{m}$ の透明フィルムを用いることができる。

【0014】

支持体の表面には、必要により公知の下塗層もしくは接着層を設けて、親水性ポリマー層との接着を強固にすることができる。親水性ポリマー層を設けない場合は、少なくとも枠体側の支持体自体の表面が検体が枠体で仕切られた区画内全面に拡がりうる程度に親水性でなければならない。そこで、支持体自体が撥水性、疎水性の場合には少なくとも当該程度まで親水化处理する必要がある。

【0015】

親水性ポリマー層は支持体上に設け、その間には前記下塗層や接着層のほかに他の層を介在させないことが好ましい。親水性ポリマー層を形成するマトリッ

クスである親水性ポリマーはこれまでドライケミストリー分析素子に使われている公知の水に可溶性、膨潤性、親水性の各種ポリマーを用いることができる。具体例としては、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリメチルビニルエーテル、ポリアクリルアミドとポリビニルピロリドンの共重合体、メチルセルロース誘導体、デンプン・アクリル酸塩グラフト共重合体架橋物、架橋ポリアクリル酸、ゼラチン（例えば、酸処理ゼラチン、脱イオンゼラチン等）、ゼラチン誘導体（例えば、フタル化ゼラチン、ヒドロキシアクリレートグラフトゼラチン等）、カルボキシメチルスターチ等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。親水性ポリマー層は原則として透明であることが好ましい。親水性ポリマー層の厚さ（乾燥時）は2～100 μm 程度、好ましくは5～50 μm 程度が適当である。

【0016】

水不透過性枠体は供給された検体を枠内に保持するものである。この水不透過性は要は枠外に水性の検体を漏出させないものであればよく、枠体は無孔性のもののほか、隙間等の空間があっても枠体に撥水性のものを用いてその撥水作用によって水不透過性を発揮するものであってもよい。この枠体は単一の枠よりなるものと2以上の区画に仕切るものに分けられる。2以上の区画に仕切る場合の区画数は特に制限されないが2～100区画程度、特に4～25区画程度が具体例として挙げられる。枠体は水不透過性支持体の上を仕切るものであるが、その下端は水不透過性支持体の上に限らず、その下にまで達していてもよい。具体的態様を単一枠を例に述べると、図1～3に示すものがある。図1の乾式分析素子は、水不透過性支持体1と水不透過性枠体2が一体に形成され、その内部に分析に必要な試薬の乾燥物4が配置されている。5は検体である。図2の乾式分析素子は、水不透過性支持体1の上に、分析に必要な試薬を含む親水性ポリマー層である試薬層3が塗設され、その上に枠体2が設置されている。図3の乾式分析素子は、枠体2が支持体1と試薬層3の外周縁を取囲む形で設置されている。枠で仕切られた区画の形状は特に制限されず、4角形、6角形、円形等を例として挙げることができる。区画の大きさは直径が0.05～7.5 mm程度、好ましくは0.4～6 mm程度が適当である。枠体の高さは検体を保持できる高さがあれば

よく、支持体の上（親水性ポリマー層が設けられている場合はその上）の高さが 0. 0 1 m m 以上、好ましくは 0. 3 ~ 1. 0 m m 程度が適当である。枠体の材質はナイロン、ポリエチレン、テフロン、ポリスチレンなど疎水性のものでもよいが、親水化処理することが好ましい。

【 0 0 1 7 】

この枠体は検体を枠内に保持しうる状態で設置されていればよく、接着剤等で支持体や親水性ポリマー層に接着させるほか、単に置くだけでもよい。上記接着剤は例えば前述の親水性ポリマーのなかから選択することができる。

【 0 0 1 8 】

本発明の乾式分析素子は基本的には枠体と親水性ポリマー層と支持体からなり、他の層は含まない。しかしながら、親水性ポリマー層と支持体の間には機能層、例えば従来の乾式分析素子の吸水層などを設けることができる。

【 0 0 1 9 】

この乾式分析素子の大きさは、円の場合には直径、4 角形の場合は辺の長さで 1 ~ 1 5 m m 程度、通常 4 ~ 1 2 m m 程度でよい。

【 0 0 2 0 】

本願発明においては、対象とする被検物質は特に限定されない。通常臨床検査の分野で測定される酵素、脂質、無機イオン、代謝産物、蛋白質等の他、各種グロブリン、免疫抗原、免疫抗体等の生体由来成分、薬物、ホルモン、腫瘍マーカー、DNA、RNA 等、分析方法さえ確立していれば、分析対象とすることができる。

【 0 0 2 1 】

本発明の乾式分析素子は分析に必要な全ての試薬を含んでいることが好ましい。この試薬は公知の乾式分析素子と同じでよい。分析に必要な全ての試薬とは、必要不可欠な試薬であり、その他の試薬は適宜追加あるいは削除される。試薬は原則として全てが枠内の各空間あるいは親水性ポリマー層に含有させる。試薬を含有させる方法は試薬溶液あるいは親水性ポリマー溶液に含有させてこれを支持体に塗布する方法、支持体上に噴霧あるいは点着する方法、スピンコーターを用いる方法などがある。試薬の乾燥はその熱安定性により、加熱乾燥、減圧乾燥、

凍結乾燥等が行われる。一方、試薬は予め含有させておらずに、測定の際に検体と共に（前後、同時に）添加することもできる。

【0022】

検体の供給量の5～100 μ l程度、通常5～60 μ l程度でよい。

【0023】

インキュベーションの条件は乾式分析素子と同様でよい。

【0024】

反応終了後の側光は支持体の上側、下側、横方向のいずれからでもよく、また、反射測光、透過測光のいずれでもよい。その際、通常プリズムや鏡を利用することもできる。

【0025】

【実施例】

実施例1 総蛋白定量用乾式分析要素1の作製

ゼラチンが下塗りされている厚さ180 μ mのポリエチレンテレフタレート無色透明フィルム上に、下記の組成を有する水溶液を塗布し、乾燥して試薬層を形成した。

AA-NVP-MA共重合体	24.9 g/m ²
界面活性剤	5.4 g/m ²
グリセリン	3.4 g/m ²
硫酸銅	12.5 g/m ²
L(+)酒石酸	7.3 g/m ²
LiOH	13.4 g/m ²
(+)酒石酸水素ナトリウム	0.9 g/m ²

【0026】

ここで、AA-NVP-MA共重合体は、アクリルアミド-ビニルピロリドン-メタリアルコールを示す。

【0027】

界面活性剤は、ポリオキシ（2-ヒドロキシ）プロピレンニルフェニルエーテル（Surfactant 10G、オーリン社製）を用いた。

【0028】

上記分析要素に枠体として直径1 cmの円を打ち抜いた厚さ0.8 mmのプラスチックシートを接着し、次いでこの分析要素を12 mm×13 mmのチップに裁断し、スライド枠（特開昭57-63542号公報に記載）に収めて、本発明に従う総蛋白定量用乾式分析要素1とした。

【0029】

比較例1 総蛋白定量用乾式分析要素2の作製

ゼラチンが下塗りされている厚さ180 μ mのポリエチレンテレフタレート無色透明フィルム上に、下記の組成を有する水溶液を塗布し、乾燥して試薬層を形成した。

AA-NVP-MA共重合体	24.9 g/m ²
界面活性剤	5.4 g/m ²
グリセリン	3.4 g/m ²
硫酸銅	12.5 g/m ²
L(+)酒石酸	7.3 g/m ²
LiOH	13.4 g/m ²
(+)酒石酸水素ナトリウム	0.9 g/m ²

【0030】

ここで、AA-NVP-MA共重合体は、アクリルアミド-ビニルピロリドン-メタリアルコールを示す。

【0031】

界面活性剤は、ポリオキシ(2-ヒドロキシ)プロピレンノニルフェニルエーテル(Surfactant 10G, オーリン社製)を用いた。

【0032】

次に、上記試薬層上に約30 g/m²の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編み物布地を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させた。

【0033】

このようにして、ポリエチレンテレフタレート無色透明フィルム、試薬層及び

展開層をこの順に有する一体型多層分析要素を作製した。

【0034】

上記の一体型多層化学分析要素を12mm×13mm四方のチップに切断し、スライド枠（特開昭57-63542号公報に記載）に収めて、本発明に従う総蛋白定量用乾式分析要素2を作製した。

【0035】

測定例1

上記実施例1の乾式分析要素1に総蛋白濃度が、4.0, 6.5, 9.0g/dlの血清50μl点着した。各分析要素を37℃, 5分間インキュベーション後、540nmにて支持体側から反射測光した。

【0036】

このとき反射板としてテフロン製の白色板を乾式分析要素1の試薬層側に配置した。検量線を以下に示す。

総蛋白濃度 [g/dl]	OD (540nm)
4.0	0.50
6.5	0.64
9.0	1.06

$$\text{ODレンジ} = \text{OD (総蛋白: 9.0 g/dl)} - \text{OD (総蛋白: 4.0 g/dl)}$$

1)

$$= 1.06 - 0.5$$

$$= 0.56$$

【0037】

一方、比較例1の乾式分析要素2に総蛋白濃度が、4.0, 6.5, 9.0g/dlの血清50μl点着した。各分析要素を37℃, 5分間インキュベーション後、540nmにて支持体側から反射測光した。

【0038】

検量線を以下に示す。

総蛋白濃度 [g/dl]	OD (540nm)
4.0	0.92

6. 5

1. 07

9. 0

1. 19

ODレンジ=OD (総蛋白: 9.0 g/dl) - OD (総蛋白: 4.0 g/dl)
1)

= 1. 19 - 0. 92

= 0. 27

【0039】

上記結果より明らかなように、実施例1のODレンジは、比較例1に比べ、2倍のODレンジがとれることがわかる。

【0040】

実施例2 HCG測定用乾式分析要素3の作製

180 μ mの無色透明ポリエチレンテレフタレート(支持体)上に下記の塗布量になるように試薬溶液を塗布し、乾燥して試薬層を設けた。

カルボキシメチルスターチ 5. 8 g/m²

抗HCG抗体感作ラテックス(粒径2. 5 μ m) 1. 6 g/m²

牛血清アルブミン 1. 6 g/m²

【0041】

上記分析要素に枠体として直径1 cmの円を打ち抜いた厚さ0. 8 mmのプラスチックシートを接着し、次いでこの分析要素を12×13 mmのチップに裁断し、特開昭57-63452号公報に記載のスライドの枠に収めて、本実施例2の乾式分析要素3とした。

【0042】

比較例2 HCG測定用乾式分析要素4の作製

180 μ mの無色透明ポリエチレンテレフタレート(支持体)上に下記の塗布量になるように試薬溶液を塗布し、乾燥して試薬層を設けた。

カルボキシメチルスターチ 5. 8 g/m²

抗HCG抗体感作ラテックス(粒径2. 5 μ m) 1. 6 g/m²

牛血清アルブミン 1. 6 g/m²

【0043】

次に、上記試薬層上に約 30 g/m^2 の供給量で水を全面に供給して湿潤させた後、50デニール相当のポリエチレンテレフタレート紡績糸を36ゲージ編みしたトリコット編み物布地を軽く圧力をかけて積層し、乾燥させた。

【0044】

このようにして、ポリエチレンテレフタレート無色透明フィルム、試薬層及び展開層をこの順に有する一体型多層分析要素を作製した。次いでこの分析要素を $12 \times 13 \text{ mm}$ のチップに裁断し、特開昭57-63452号公報に記載のスライドの枠に収めて、本比較例2の乾式分析要素4とした。

【0045】

測定例2 HCG測定

上記実施例2及び比較例2の乾式分析要素にSIGMA社製、Human Chorionic Gonadotropin (HCG) を 100 mM リン酸バッファー (pH 7.4) で希釈し、0.5, 25, 100, 500 IU/mL の系列を $50 \mu\text{L}$ 点着した。各分析要素を 37°C にて5分間インキュベーション後、 650 nm にて支持体側から反射濃度を測定した。このとき支持体側からの入射光の内、反応に伴い試薬層を透過した光を吸収するための色板には黒色板を用いた。

【0046】

検量線を以下に示す。

HCG濃度 [IU/mL]	実施例2	比較例2
	OD (650 nm)	OD (650 nm)
0	1.010	0.325
5	1.100	0.330
25	1.201	0.320
100	1.280	0.335
500	1.374	0.320

【0047】

上記検量線に示されるように、実施例2の乾式分析要素3では、HCGの定量測定が行えることが示された。

【 0 0 4 8 】

【発明の効果】

本発明の乾式分析素子は、湿式法と乾式法の長所を併せて有するものであり、少量の検体を用いて迅速かつ簡便に測定を行うことができ、比色分析のほか凝集反応や凝固反応なども測定できる利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の乾式分析素子の構造の一例を示す断面図である。

【図 2】 本発明の乾式分析素子の構造の別の一例を示す断面図である。

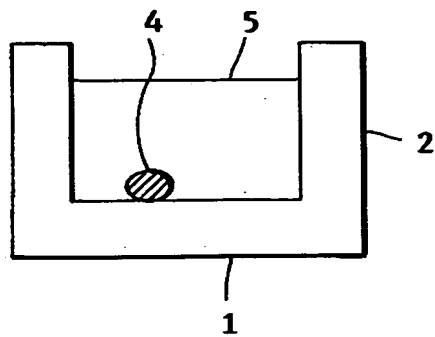
【図 3】 本発明の乾式分析素子の構造の別の一例を示す断面図である。

【符号の説明】

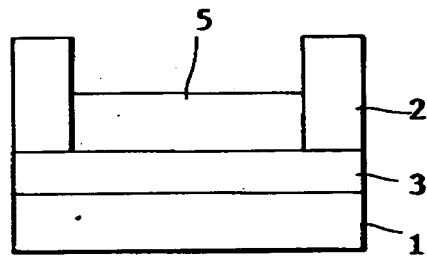
- 1 … 支持体
- 2 … 枠体
- 3 … 試薬層
- 4 … 試薬乾燥物
- 5 … 検体

【書類名】 図面

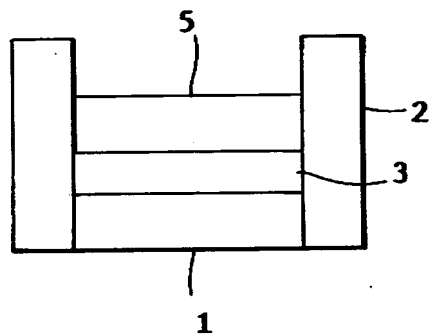
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 少量の検体で簡便かつ迅速に測定でき、しかも比色分別のほか凝集反応や凝固反応などを測定できる分析具を提供する。

【解決手段】 上記課題は、水不透過性支持体の上が水不透過性枠体で仕切られ、その枠内に分析に必要な試薬を有している、展開層を有しない乾式分析素子によって達成される。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005201]

1. 変更年月日	1990年 8月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	神奈川県南足柄市中沼210番地
氏 名	富士写真フイルム株式会社